

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

25/01/2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

RENATA MENDONÇA MORAES

**ESTRESSE E PERIODONTITE: avaliação da inervação simpática no
periodonto e da resposta adrenérgica após infecção por
*Porphyromonas gingivalis***

2022

RENATA MENDONÇA MORAES

ESTRESSE E PERIODONTITE: avaliação da inervação simpática no periodonto e da resposta adrenérgica após infecção por *Porphyromonas gingivalis*

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação, reparação tecidual e patologia do sistema estomatognático

Orientadora: Prof. Assoc. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Moraes, Renata Mendonça

Estresse e periodontite: avaliação da inervação simpática no periodonto e da resposta adrenérgica após infecção por *Porphyromonas gingivalis* / Renata Mendonça Moraes. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

107 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Ana Lia Anbinder.

1. Periodontite. 2. Sistema nervoso simpático. 3. Estresse. 4. *Galleria mellonella*. 5. Invertebrados. I. Anbinder, Ana Lia, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Victor Angelo Martins Montalli

Faculdade São Leopoldo Mandic

Faculdade de Odontologia

Campus de Campinas

Prof. Assoc. Gustavo Ferreira Martins

Universidade Federal de Viçosa

Departamento de Biologia Geral

Campus Universitário Viçosa

Prof. Assoc. Marcos Dias Pereira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Química

Campus Rio de Janeiro

São José dos Campos, 25 de Janeiro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todos os pesquisadores que ousam sonhar e perseveram mesmo quando tudo parece ir contra.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (UNESP) e ao programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal e Ciências Aplicadas a Saúde Bucal (CASB), pela aprovação no programa e pela disponibilização das atividades e infraestrutura que possibilitaram que este trabalho fosse executado.

À FAPESP pelo financiamento deste projeto (processo 2018/25933-3), concessão da bolsa regular no país (processo 2017/26461-5) e bolsa de estágio no exterior BEPE (processo 2018/21701-0), assim como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de 6 meses de bolsa (01/02/2018 - 31/07/2018) e pelo apoio ao programa CASB.

À minha orientadora, Ana Lia Anbinder, pela longa jornada acadêmica, que me introduziu ao mundo da ciência em 2008 com a minha iniciação científica, seguida pelo meu título de mestre em 2014 e início do doutorado em 2018. Ao longo destes anos aprendi, pelo exemplo, bases fundamentais para o desenvolvimento de uma pesquisa sólida, transparente e que dentro da realidade vivida fosse o mais impactante possível. Obrigada por propiciar um ambiente acolhedor aos questionamentos e fértil ao desenvolvimento. Admiro imensamente a sua paixão pela profissão e seu dom para ensinar, que sempre terei como exemplos de competência. Juntas também aprendemos muito sobre planejamento, trabalho em equipe e acima de tudo resiliência. Quantos momentos nos fizeram mais resilientes! Quando no início quase perdi a submissão de um dos nossos artigos porque não sabia que “major revisions” significava submeter com as correções; Os milhões de pilotos para aquele trabalho da *Bone*; Ficar até altas horas da noite fazendo crachás porque a iniciação esqueceu; Sair para comprar tênis que você nem precisava para agradar a *Lab manager*; Viajar no porta mala do carro para que todos pudessem ir te prestigiar na *UTHealth* e tantos outros momentos que dividimos. Começamos como aluna e professora, mas hoje tenho em você uma amiga!

À minha família que, sem nenhuma dúvida, é meu maior alicerce e sem os quais eu nunca teria chegado até esse momento. Obrigada por me ensinarem o valor dos estudos e o peso de poder honrar com a nossa palavra, qualidades que sem dúvida são imprescindíveis tanto na vida quanto na carreira acadêmica.

To my fiancé Dr. Fabio Stossi, definitely the greatest and happiest surprise of my PhD. Together we fell in love with each other and for our babies (G. mellonella)! First you captivated me with all the wonders of microscopy and the knowledge behind pretty pictures. The imaging classes and the core were my happy place at Baylor! So much fun imaging cleared jaws and embryos. Once we got apart, we somehow became even closer, and your excitement and curiosity about my second project were definitely what got me thought it all! We built together every part of it, and thanks to you I have my amazing heat maps! I will never have words to express how grateful I am for every kind and encouragement word you said, every hug (even virtually) and all the tears you bored with me. This victory is ours!

Aos meus colegas de laboratório Jaqueline Ribeiro, Thaís Aguiar e Carlos Matheus Lescura. Apenas quem trabalha com animais sabe da ligação que se cria com aqueles que te acompanham diariamente na labuta. Eu não poderia ser mais feliz de ter tido vocês como meus companheiros durante esses 4 anos.

A minha querida amiga Bruna, irmã que a vida me trouxe em um dos meus piores momentos, mas que como dizem: "Nos campos solitários e nos cumes desérticos nascem as mais belas flores." E a nossa amizade com certeza é uma das mais belas flores do meu jardim! Sua presença fez com que a infinidade que esse doutorado durou ficasse mais leve e divertida.

A minha amiga/parceira Maíra que sempre entrou nas minhas loucuras que resultaram em infinitas horas contando hemócitos e fazendo leituras no espectrofotômetro! Sem a sua ajuda esse trabalho certamente não seria o mesmo. Acima de tudo, sem você o gosto deste doutorado não seria o mesmo! Muito obrigada por cada bolo e delícia que você cozinhou para a gente, e que acompanharam nossas conversas sobre tudo. Obrigada também pelos momentos off do laboratório, quando

podemos nos divertir, e por me tirar da zona de conforto me levando para a maior trilha de praias da história e a cachoeira mais gelada!

Aos amigos da microbiologia Patrícia, Evelyn, Rodnei e Felipe. Sempre senti a microbiologia como a minha segunda casa na faculdade e com certeza isso se deve a vocês. Patrícia, minha companheira de viagem, almoços, cafés e PCR! Exemplo de profissional competente e que sempre foi solícita para me ajudar e discutir resultados. Evelyn, minha parceira de almoços, coloração de gram, e principalmente “papo de beleza”. Meus dias não eram os mesmos sem você no laboratório, sempre me fazendo rir e meu cabelo é muito mais hidratado depois que nos conhecemos, rs! Rodnei, amigo de congresso que virou amigo para vida e agora brilha longe da gente, mas que sempre deixará sua marca, inclusive neste trabalho, por ter sido um dos pioneiros do cultivo de *P. gingivalis* no laboratório. Por fim, Felipe, que me ajudou muito com a parte de entomologia e que mesmo longe está sempre respondendo nossas dúvidas sobre tudo.

Aos técnicos de laboratório, em especial ao Sérgio, técnico da patologia, por todo o suporte na parte histológica deste trabalho, mas também pela companhia nos momentos de pandemia, quando éramos os únicos no laboratório e ele sempre me deixava aguarda por sobremesas fit.

To my abroad supervisor Florent Elefteriou, for receiving me in his lab with open arms and giving me all the support I needed to conduct my research. Also, for training me to be more critic on my way of doing science and thinking about it. Definitely the weekly lab meetings were a game changer for my career. But, most importantly, thank you for all the barbecues and for liking moussaka and Crème brûlée, forcing Efie to cook for us!

To my wifey/roommate Efie. They say that opposites attract each other, and for us it was definitely true! An outgoing, hyperactive, and joyful person meets the introvert, moody and Netflix-addict Brazilian gal. But this match could not have been better! You made my year abroad one of the best of my life. You thought me cell culture, animal work and we troubleshooted lots of histology together, but it was the crazy moments that will be forever with me. Running from snakes, sunset hunting, garage sales that

ended up in drying clothes on the neighbor, travelling to Chicago to stay in a house full of cats, being stuck in the lab because of storms, waking up in the middle of the night with your “OPA” to get appendix surgery, being the queens of Tropicana, and surviving a pandemic together and creating an even deeper connection during lockdown. Thank you for inspiring me to be the BEST scientist out there!

To my lab mates, Greig, Lingzhen and Maria. Greig, you are one of the best scientists I have ever met, thank you so much for helping me to improve my study design skills. Lingzhen for all the support during mice work, and teaching me how to genotype and transforming me on the RNA extraction queen of the lab. But more than that, thank you for making me feel so welcome in a foreign place, and for all the amazing Chinese food you introduced to me! Maria, the lovely girl from Germany. So precise in every experiment, thank you very much for all the support during Cre assessment troubleshoot and for the talks during lunch and happy hours.

À profa. Juliana Campos Junqueira, por sempre abrir as portas da microbiologia para mim, e por permitir que eu pudesse fazer parte do grupo de pesquisadores envolvidos com a criação de *G. mellonella*. Obrigada por todos os seus comentários durante o meu exame de qualificação, que com certeza elevaram a qualidade desta tese, e também pelo suporte durante a análise histológica e por dividir os cafezinhos diários que nos acordavam depois do almoço!

Aos prof. Estela e Rubens Tango que estiveram no mesmo período que eu em Houston, e me acolheram tão generosamente em sua casa quando fiquei sem teto! Por me lavarem para passear e ouvir todos os meus perrengues e a busca pela bota cowboy rosa perfeita! Por todos os happy hours, almoços, cafés brasileiros divididos e por estarem comigo na minha primeira Black Friday americana, fazendo 3 horas de fila passarem tão rápido!

Aos membros da banca, que disponibilizaram o seu tempo e conhecimento para a leitura desta tese, e certamente possibilitaram que ela atingisse o seu maior potencial.

À profa. Mônica, que disponibilizou o CEBAPE para realização de trabalhos em animais e uso do histotécnico e micrótomo. Sempre muito solícita em ajudar e com uma palavra amiga.

Aos amigos que indiretamente fizeram parte dessa jornada, meu muito obrigada!

*"Out of the night that covers me,
Black as the Pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.*

*In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.*

*Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.*

*It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul."*

William Ernest Henley

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 ARTIGOS	25
2.1 Artigo 1 – Moraes RM, Elefteriou F, Anbinder AL. Response of the periodontal tissues to β -adrenergic stimulation*. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119776 . Repositório UNESP: https://repositorio.unesp.br/handle/11449/214063	25
2.2 Artigo 2 –Moraes R M, Garcia M T, Stossi F, Barros PP, Junqueira JC, Anbinder AL. Adrenergic signaling and periodontitis: insights on innate immunity and <i>Porphyromonas gingivalis</i> virulence in an invertebrate model*	40
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	75
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES.....	99
ANEXO.....	107

RESUMO

Moraes RM. Estresse e periodontite: avaliação da inervação simpática no periodonto e da resposta adrenérgica após infecção por *Porphyromonas gingivalis* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

O estresse agrava a doença periodontal por vários mecanismos, sendo a estimulação do sistema nervoso simpático (SNS) um deles. A literatura mostra que a estimulação de receptores β -adrenérgicos (β -AR) aumenta a angiogênese em ossos longos, e a expansão microvascular agrava a periodontite. Ainda, catecolaminas aumentam a virulência de periodontopatógenos e agem na resposta imune. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar: (1) a inervação simpática no periodonto e a influência da ativação do SNS na vascularização periodontal em camundongos e (2) a influência do sistema adrenérgico nos fatores de virulência de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e na resposta imunológica a este patógeno *in vivo* (*Galleria mellonella*). Na primeira parte, camundongos receberam injeção intraperitoneal de solução salina (PBS) ou isoproterenol (ISO; agonista não seletivo β adrenérgico) por 1 mês, para detecção *in situ* de tirosina hidroxilase, neuropeptídeo Y, transportador de norepinefrina (NET) e endomucina em mandíbulas. Expressão de mRNA de *Vegf-a*, *Il-1 β* , *Il-6*, *Adrb2* e *Rankl* foi quantificada 2 h após administração de ISO/PBS em mandíbula e tíbias, que serviram como controle positivo. Diferentemente das tíbias, não houve alteração na expressão dos genes analisados em mandíbula. Por outro lado, NET foi mais expresso no osso alveolar do que na tíbia, sendo detectado nos osteoblastos, osteócitos e células do ligamento. Embora o padrão de inervação e a expressão de *Adrb2* sejam semelhantes entre mandíbula e tíbia, o tratamento com ISO não influenciou no número e área de vasos positivos para endomucina. Na segunda parte, investigamos a influência adrenérgica na resposta imune de *G. mellonella* durante infecção por Pg utilizando norepinefrina (NE; agonista α e β adrenérgico) e ISO. Pg também foi cultivada na presença de ISO (PgISO) ou NE para avaliação da ação direta dos compostos na bactéria. ISO sistêmico protegeu as larvas da infecção por Pg, aumentando o número de hemócitos e reduzindo a contagem de células de Pg na hemolinfa, exclusivamente pelo β -AR. Diferentemente, NE aumentou mortalidade, diminuiu o número de hemócitos. Apenas PgISO aumentou a morte das larvas, apesar de ambos, NE e ISO, terem aumentado a expressão de fatores de virulência na bactéria *in vitro*. ISO circulante, concomitante com PgISO, reduziu parcialmente a mortalidade das larvas. A influência do estresse na doença periodontal envolve diversas vias que alteram os dois pilares da periodontite (microbiota e sistema imune). No entanto, a ação na resposta do hospedeiro parece ser superior, uma vez que a estimulação β -AR em osso alveolar saudável não alterou a produção de citocinas pró-inflamatórias ou microvascularização e a modulação da resposta imune em *G. mellonella* por compostos adrenérgicos foi mais importante para o desfecho da infecção que sua ação direta sobre a bactéria.

Palavras-chave: periodontite; sistema nervoso simpático; estresse; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Moraes RM. Stress and periodontitis: evaluation of sympathetic innervation in the periodontium and the influence of adrenergic signaling on Porphyromonas gingivalis infection [thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

Stress aggravates periodontitis, and one possible mechanism is the activation of sympathetic nervous system (SNS). The literature shows that stimulation of β -adrenergic receptors (β -AR) induces angiogenesis in long bones, and microvasculature amplification was linked to periodontitis severity. Moreover, catecholamines increase the virulence of some periodontopathogenic bacteria *in vitro* and influences the innate immunity. Thus, the aim of this study was (1) evaluate the presence and influence of the SNS in the stimulation of periodontal vasculature, and (2) the influence of the adrenergic system on Porphyromonas gingivalis (Pg) virulence and on the immunological response to this pathogen *in vivo* (Galleria mellonella larvae). For the first part, mice received isoproterenol (ISO, a non-selective β -AR agonist) or saline (PBS) for 1 month, for *in situ* analysis of tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, norepinephrine transporter (NET) and endomucin in the mandibles. Vegfa, Il-1 β , Il-6, Adrb2 and Rankl mRNA expression was assessed 2 hours after PBS/ISO treatment for mandibles and tibia, that served as positive control. We observed that, differently from the tibia, the expression of these genes did not alter on the mandible. However, NET expression was detected in osteoblasts, osteocytes, and periodontal ligament fibroblasts, and were higher expressed when compared to the tibias from the same animals. Although the pattern of sympathetic innervation and Adrb2 expression were similar between tissues, ISO treatment did not increase the area or number of endomucin+ vessels. For the second part, we addressed the adrenergic signaling influence on G. mellonella immune system during Pg infection using norepinephrine (NE, α - and β -AR agonist), ISO and octopamine (insect's endogenous hormone). Pg was also cultivated in the presence of ISO (PgISO) or NE to investigate the direct action of the ligands on bacterial virulence. Systemic administration of ISO protected the larvae from Pg infection by increasing hemocyte density accompanied by reduction of Pg load in hemolymph, in a β -AR manner. In contrast, NE increased mortality, with decreased hemocyte count and no influence on the other parameters. Only PgISO increased larvae death, despite of ISO and NE increased virulence *in vitro*. The concomitant injection of systemic ISO partially reversed the toxicity of the PgISO. The influence of stress on periodontitis involves different pathways, that alter the two pillars of disease's pathogenesis (microbiota and immune system). However, the influence on the host's inflammatory response seems to overcome the other players, since β -AR activation on healthy alveolar bone didn't alter cytokines production or microvasculature. Besides, the modulation of innate immunity by adrenergic signaling in G. mellonella was more important for the disease's outcome than it's direct action on the bacteria.

Key-words: periodontitis; sympathetic nervous system; stress; Galleria mellonella.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença altamente prevalente, que acomete até 70% dos adultos com 65 anos ou mais (Eke et al., 2016; Billings et al., 2018). É uma patologia inflamatória crônica multifatorial associada à disbiose da microbiota oral, decorrente da complexa interação entre os micro-organismos e a resposta imunológica do hospedeiro, que leva à destruição dos tecidos de suporte do dente (Papapanou et al., 2018). Algumas condições, conhecidas como fatores de risco, são capazes de modular a progressão da doença. Dentre esses fatores encontram-se: condições genéticas (como polimorfismos, síndromes, predisposição genética a diabetes e outras comorbidades), obesidade, tabagismo, idade, doenças sistêmicas (como diabetes/osteoporose) e estresse (Genco, Borgnakke, 2013).

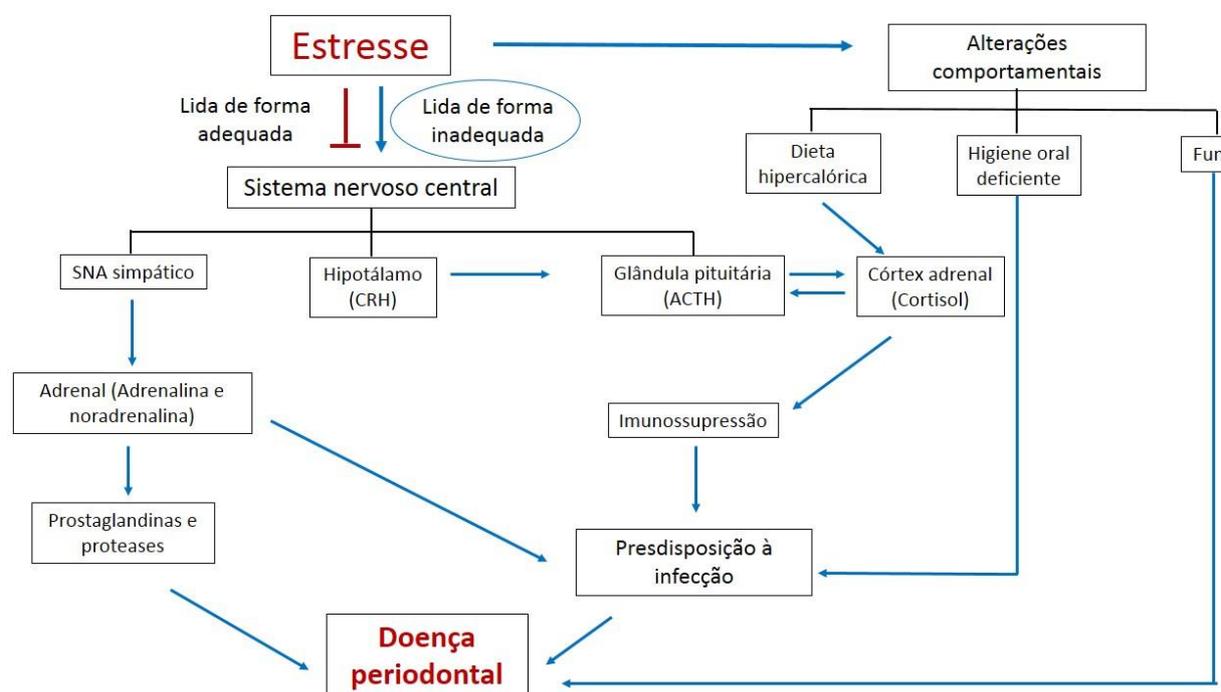
O estresse é definido como um estado em que a homeostase está ameaçada ou prestes a ser ameaçada, e que pode ser desencadeado por uma série de fatores tanto físicos quanto emocionais. O estresse agudo gera prontamente uma resposta fisiológica para atenuar os gatilhos, apresentando uma ação rápida e limitada. Já o estresse crônico se desenvolve após exposição repetida ou prolongada aos estressores (Hering et al., 2015). Uma vez instalado, o estado de estresse ativa o sistema nervoso central (SNC) e periférico, que liberam uma série de neurotransmissores e hormônios. Os principais mediadores periféricos são os glicocorticoides (cortisol), liberados pelo eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) e as catecolaminas, epinefrina e norepinefrina (NE), liberados pelo sistema nervoso simpático (SNS), tanto pela medula adrenal quanto pelas terminações nervosas periféricas (NE). Durante o estresse crônico há uma liberação sustentada desses mediadores do estresse (epinefrina, NE e cortisol), que deveriam ser liberados em quantidade limitada por um tempo determinado, mas que ficam descontrolados (Chrousos, 2009).

A correlação entre o estresse e a doença periodontal vem sendo evidenciada na literatura. Foi constatado que o estresse leva à congestão e hipertrofia das paredes dos vasos, à hemorragia, e alteração na direção e conformação das fibras colágenas no periodonto saudável de ratos (Antonova, 2008). Ainda, o estresse, combinado à indução de periodontite experimental, pelo método de ligadura ao redor dos molares (Gaspersic et al., 2002) ou por infecção com *Porphyromonas gingivalis* (Nakajima et al., 2006), acentua a perda óssea e de inserção periodontal em ratos. Da mesma

forma, estudos em humanos demonstram piora nos parâmetros clínicos da doença periodontal, como profundidade de sondagem, índice de placa, índice gengival e perda dentária em pacientes estressados (Deinzer et al., 1999; Rosania et al., 2009; Goyal et al., 2011; Rai et al., 2011).

Os exatos mecanismos pelos quais o estresse influencia a doença periodontal ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que a ativação dos sistemas supracitados com liberação de cortisol e catecolaminas possam interferir na resposta inflamatória do hospedeiro, o que favoreceria o acúmulo de biofilme dental e a disbiose (Genco et al., 1999; Warren et al., 2014). Estudos clínicos demonstram claramente o aumento da liberação de cortisol sérico em pacientes sob estresse (Deinzer et al., 2000; Rosania et al., 2009; Goyal et al., 2011; Rai et al., 2011), e o aumento deste hormônio impacta negativamente o quadro clínico da periodontite devido à imunossupressão. O estresse também pode levar a alterações de comportamento como: tabagismo, negligência com a higiene oral e dieta hipercalórica. O fumo por si só, tem efeito negativo sobre a doença periodontal, por influenciar na microbiota e microvascularização local, predispondo à colonização de bactérias anaeróbias. Também altera a resposta de neutrófilos e produção de citocinas, favorecendo a infecção e a inflamação exacerbada que leva à perda de tecidos periodontais (Genco, Borgnakke, 2013). A má higiene oral predispõe à doença, uma vez que não há a remoção adequada do biofilme. E por fim, a ingestão de dieta hipercalórica pode levar à ativação do córtex adrenal e liberação do cortisol que, como já explanado anteriormente, leva à imunossupressão e agravamento da infecção com piora da doença periodontal (Figura 1) (Genco et al., 1999).

Figura 1 - Esquema das vias de ação do estresse na doença periodontal



Legenda: ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; CRH: hormônio liberador de corticotrofina.

Fonte: Esquema extraído e modificado de Genco et al., 1999.

Embora a ação do eixo HPA na patogênese da doença periodontal tenha sido profundamente estudada, a influência do SNS ainda é pouco compreendida. O SNS, na sua região final de atuação, se liga a receptores específicos nas células chamados receptores adrenérgicos (AR), sendo subdivididos em α e β , que são ativados pela epinefrina ou NE. Embora a maioria dos neurônios simpáticos utilizem a epinefrina/NE como neurotransmissores principais, existem populações neuronais não-adrenérgicas que incluem neuropeptídeo Y, galanina, somastatina e opioides (Gibbins, 2013). O SNS age nos dois pilares da patogênese da doença periodontal: hospedeiro (inflamação e células residentes do periodonto) e microbiota.

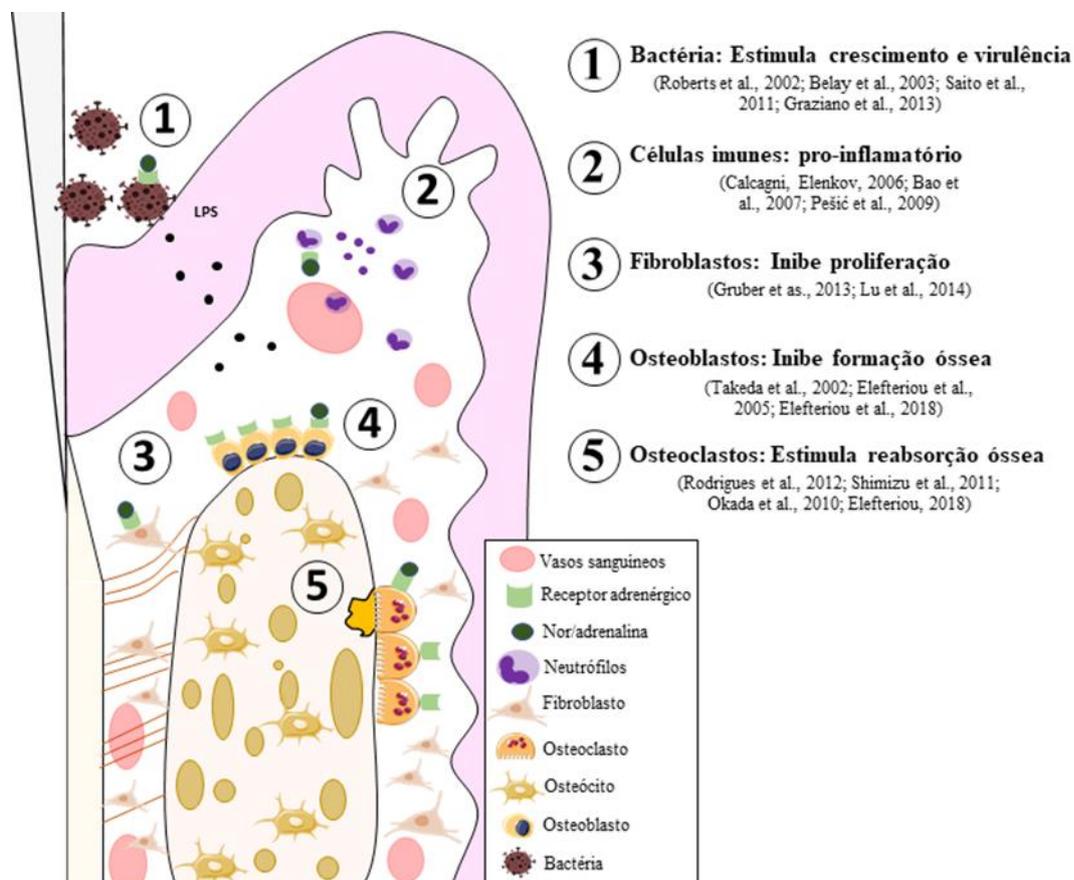
O SNS constitui a principal comunicação entre SNC e a resposta imunológica. Todas as células imunes possuem receptores adrenérgicos, que quando ativados são capazes de modificar o número e proporção das células que participam da resposta imune, assim como alterar a resposta individual dessas células (Calcagni, Elenkov, 2006; Bao et al., 2007; Pešić et al., 2009; Scanzano, Cosentino, 2015). Além da influência do SNS nas células inflamatórias, também foi evidenciada sua ação em células residentes do periodonto por meio dos receptores adrenérgicos. Foi constatado que os fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal expressam β 2-

AR, sendo que a administração do isoproterenol (ISO- agonista não seletivo β adrenérgico) e do salbutol (agonista seletivo β 2-AR) diminuíram sua proliferação *in vitro*, fenômeno que foi abolido pela adição do propranolol (antagonista β -adrenérgico; Gruber et al., 2013). O mesmo foi evidenciado para o α 1-AR, sendo que houve diminuição da proliferação celular e aumento da expressão de α 1-AR após o tratamento de células do ligamento periodontal com lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, o bloqueio do α 1-AR (fentolamina, antagonista não seletivo de receptores α adenérgicos) inibiu a produção de interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8 (Lu et al., 2014).

Alguns estudos *in vivo* suportam a hipótese do envolvimento dos β -AR na patogênese da doença periodontal. Observou-se inibição da diferenciação osteoclástica e redução da perda óssea alveolar em ratos tratados com propranolol, por injeção intraperitoneal ou via oral (Okada et al., 2010; Shimizu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012). Em estudo do nosso grupo de pesquisa, verificamos que o propranolol e o ISO apresentam efeitos antagônicos na perda de colágeno gengival durante a indução da doença periodontal em ratos e, que ISO aumentou a perda óssea alveolar (Martins et al., 2017).

A influência do SNS no controle do metabolismo ósseo, modulando a reabsorção óssea e a atividade das células ósseas, é bem estabelecida (Elefteriou, 2018). Os primeiros indícios da influência neuronal no metabolismo ósseo foram observados pela descoberta da regulação da reabsorção óssea pela leptina, hormônio sintetizado pelos adipócitos, que age no metabolismo energético e controle do apetite. Foi evidenciado em experimentos com animais *knockout* em leptina, que estes animais apresentavam maior massa óssea (Elefteriou, 2005). A leptina também estimula a atividade do SNS, causando a diminuição da massa óssea através da ativação de β 2-AR expresso em osteoblastos, levando à diminuição da proliferação dessas células (Takeda et al., 2002). Similarmente, camundongos *knockout* para β 2-AR apresentam massa óssea aumentada (Elefteriou, 2005). A estimulação de β 2-AR em camundongos e ratos promove uma resposta osteoclastogênica, mensurada pelo aumento da perda óssea e formação de osteoclastos. Acredita-se que este efeito é devido ao aumento de Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B (RANKL) e IL-6, e a estimulação dos β -AR também afeta a formação óssea inibindo a proliferação osteoblástica (Elefteriou, 2018) (Figura 2).

Figura 2 - Desenho esquemático de um dente e do periodonto associado, evidenciando dos potenciais mecanismos de ação do SNS na iniciação e progressão da doença periodontal



Legenda: Os números indicam o efeito da ativação do sistema nervoso simpático nos vários agentes associados à patogênese da doença periodontal. As fibras simpáticas presentes no periodonto liberam catecolaminas que se ligam aos receptores presentes nas células desta região. Epinefrina/NE podem agir no biofilme, estimulando o crescimento de algumas bactérias e a virulência de outras, como *Porphyromonas gingivalis*, bactéria keystone para o desenvolvimento da periodontite (1). As catecolaminas também podem se ligar a receptores adrenérgicos nas células inflamatórias, favorecendo um perfil pró-inflamatório, promovendo agregação plaquetária e ativação de neutrófilos (2). Ao se ligarem aos receptores nos fibroblastos, inibem a sua proliferação (3), impactando no reparo e remodelação tecidual. Nas células ósseas, já foi provado que as catecolaminas inibem a proliferação de osteoblastos em ossos longos (4) e promovem osteoclastogênese (5) também no osso alveolar, podendo agravar assim a perda óssea. Fonte: Elaborada pelo autor.

Além dos efeitos diretos nos receptores adrenérgicos das células ósseas, o SNS pode causar alguns efeitos indiretos no osso, como a regulação do suprimento sanguíneo. Nosso grupo constatou que o ISO estimula a produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em ossos longos de camundongos adultos e em células tronco da medula óssea, aumentando a densidade vascular óssea, com aumento de vasos CD31 e endomucina-positivos (endomucina+), através da ativação

do β 2-AR em osteoblastos (Mulcrone et al., 2017). A presença de neuropeptídeos do SNS foi identificada em associação aos vasos sanguíneos do periodonto. Fibras nervosas imunorreativas ao neuropeptídeo Y foram identificadas ao redor dos vasos sanguíneos, no gânglio trigeminal, polpa dental e ligamento periodontal de ratos saudáveis (Wakisaka et al., 1996). Ainda em artérias e arteríolas do ligamento periodontal de ratos saudáveis, observou-se a presença de fibras positivas para a tirosina-hidroxilase (TH, enzima que converte a L-DOPA em dopamina, precursora da epinefrina e NE) (Norevall et al., 1996). A TH é um dos mais relevantes biomarcadores da superatividade do SNS durante o estresse (Dunkley et al., 2004), sendo que houve aumento da expressão de TH no ligamento periodontal de ratos com e sem doença periodontal expostos ao estresse (Lu et al., 2014), e a marcação imuno-histoquímica de TH mostrou-se aumentada em humanos com doença periodontal (Memmert et al., 2019). No entanto, a sua relação com a periodontite ainda é objetivo de investigação. Uma vez que nosso estudo anterior evidenciou o efeito indireto da ativação dos β 2-AR em osteoblastos na densidade vascular em ossos longos (Mulcrone et al., 2017), hipotetizamos que a ativação dos receptores adrenérgicos no osso alveolar após a liberação de epinefrina/NE pelas fibras nervosas simpáticas, como a que ocorre em situações de estresse, poderia induzir a liberação do VEGF, aumentando assim a densidade microvascular (MVD) local.

O VEGF é o principal fator de crescimento relacionado à angiogênese e permeabilidade vascular, com papel importante nas doenças inflamatórias crônicas, dentre elas a periodontite (Aspriello et al., 2009). Esse fator de crescimento parece estar envolvido no início e progressão da gengivite e periodontite, principalmente promovendo a expansão vascular observada na inflamação (Aspriello et al., 2009). A presença do VEGF e seu receptor VEGFR foram observados em pacientes com doença periodontal leve, moderada e severa (Vladau et al., 2016). Em condições saudáveis não há a expressão de VEGF/VEGFR nos tecidos periodontais, já nas lesões periodontais iniciais o VEGF aumenta a MVD no estroma. Na periodontite moderada e avançada há aumento significativo da presença de VEGF/VEGFR (coloração imuno-histoquímica) tanto no epitélio quanto no estroma (Artese et al., 2010; Kasprzak et al., 2012; Vladau et al., 2016). Acredita-se que o aumento da MVD pode aumentar a liberação de diferentes citocinas, moléculas de adesão, e outros fatores inflamatórios, sendo que na periodontite este aumento no transporte das células inflamatórias, nutrientes e oxigênio causado pela angiogênese pode aumentar

a severidade da inflamação. Assim o VEGF agiria como um agente pró-inflamatório na periodontite (Aspriello et al., 2009; Afacan et al., 2019).

A ação do SNS é estreitamente controlada através da recaptura das catecolaminas liberadas no meio pelo transportador de NE (NET- *norepinephrine transporter*). Este transportador está presente nas fendas sinápticas e constitui um importante mecanismo de feedback negativo para limitar a duração do estímulo simpático e para repor os estoques de NE nas fibras nervosas. No entanto, foi evidenciado que outras células, além dos neurônios, expressam esse transportador, como osteoblastos e osteócitos maduros em ossos longos e que essas células são capazes de captar e metabolizar a NE (Ma et al., 2013; Zhu et al., 2018). Camundongos *knockout* para NET apresentaram redução da formação óssea e aumento na reabsorção, resultando em diminuição da massa óssea (Ma et al., 2013). Também foi observado que a expressão tanto de mRNA quanto proteica desse transportador diminui com a idade, e que os níveis de NE aumentam no fêmur em camundongos mais velhos. Esse aumento não foi acompanhado pelo aumento no precursor de NE (L-DOPA) e nem do seu metabólito 3,4-diidroxifenilglicol (DHPG), sugerindo que pode ser decorrente do déficit em recaptura da NE (Zhu et al., 2018). Tais achados sugerem que a NE liberada e recaptada pelos neurônios, osteoblastos e osteócitos representa parte de um mecanismo complexo de homeostase no qual o SNS controla o metabolismo ósseo. A presença desse mecanismo nos osteoblastos e osteócitos do osso alveolar ainda é desconhecida.

Além dos efeitos no hospedeiro, as catecolaminas também demonstram ação nos micro-organismos. A endocrinologia microbiana é a área de estudo que reconhece uma relação bidirecional entre fatores neuroendócrinos do hospedeiro e da microbiota (Lyte, 1992). A comunicação entre as espécies bacterianas e os hormônios do hospedeiro se dá através de estruturas conhecidas como sensores de quórum (*quorum sensing*), envolvidas no mecanismo de comunicação célula-célula e responsáveis por alterações genéticas na bactéria frente a estressores. Esses receptores respondem tanto à epinefrina quanto à NE e estudos *in vitro* demonstram a estimulação do crescimento de algumas bactérias como: *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces gerencsariae*, *Eikenella corrodens* e *C. gracilis* pelas catecolaminas (Belay, Sonnenfeld, 2002; Belay et al., 2003; Roberts et al., 2002; Roberts et al., 2005; Weinstein et al., 2015). No

entanto, a estimulação do crescimento bacteriano pelas catecolaminas não é uniforme, variando de acordo com o neurotransmissor e cepa bacteriana (Boyanova, 2017).

Interessantemente, parece que as catecolaminas não são capazes de induzir o crescimento de algumas bactérias gram-negativas, dentre elas *P. gingivalis* (Belay et al., 2003; Graziano et al., 2013), tendo por vezes, efeito inibitório (Roberts et al., 2002). *P. gingivalis* é uma bactéria *keystone* relacionada com o desenvolvimento da periodontite em humanos e capaz de induzir doença em roedores, e que apresenta capacidade de invasão dos tecidos e manipulação da resposta inflamatória do hospedeiro, estando relacionada inclusive a efeitos sistêmicos da periodontite como doenças cardiovasculares, neurológicas e artrite reumatoide (Hajishengallis, 2014; Fiorillo et al., 2019). Cepas distintas de *P. gingivalis* (ATCC 33277, ATCC 49417, FDC381) tiveram seu crescimento inibido na presença de NE (Belay, Sonnenfeld, 2002; Roberts et al., 2002; Saito et al., 2011). Porém, foi constatado que apesar de não induzir o crescimento de *P. gingivalis* (FDC381 e W83), a NE é capaz de aumentar a expressão de gingipaínas e, conseqüentemente, sua virulência (Graziano et al., 2013; Boyanova et al., 2017). Este aumento é abolido quando propranolol é administrado, sugerindo que *P. gingivalis* apresenta um sensor catecolaminérgico (Saito et al., 2011). Além da gingipaína (*rgpb*), também foi constatada a interferência da NE em genes relacionados ao metabolismo do ferro (TonB-dependent receptor HmuR- *hmuR*), adaptação ao estresse oxidativo (Alkyl hydroperoxide reductase subunit F- *ahpF*, *oxyR*, DNA-binding Protein from Starved cells - *dps*, Superoxide Dismutase B - *sodB*, acid phosphatase - *aphC*) e proteólise (Hemolysin - *hem*) (Saito et al., 2011; Graziano et al., 2013).

Apesar da comprovada ação da NE sobre os micro-organismos, as concentrações utilizadas nos estudos ultrapassam as encontradas no estado de normalidade. As concentrações séricas de N em humanos numa situação de homeostase variam entre 112-1109pg/mL (0,7nM-7nM) (American Board of Internal Medicine-ABIM, 2020), sendo que durante o estresse essa concentração pode variar até 20 vezes (10nM-100nM) (Boyanova et al., 2017). Já em estados patológicos como por exemplo feocromocitoma, a concentração pode-se elevar até 3161 pg/mL (20 nM) (Rocha et al., 2005). Deste modo de 0,1nM a 10nM estaríamos simulando concentrações fisiológicas, de 100nM-1µM situações de estresse e feocromocitoma (neoplasia caracterizada por liberação excessiva de NE). Os estudos *in vitro* utilizam

100µM para demonstrar a ação da NE na virulência de *P. gingivalis* (Saito et al., 2011; Graziano et al., 2013) (Figura 3).

Figura 3 – Concentrações de NE, e suas correspondências a estados fisiológicos, de estresse, feocromocitoma e influência na virulência de *P. gingivalis in vitro*

100pM	1nM	10nM	100nM	1µM	10µM	100µM
Normalidade						
		Feocromocitoma				
		Estresse				
					Virulência de <i>P. gingivalis in vitro</i>	

Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em American Board of Internal Medicine-ABIM, 2020; Boyanova, 2017; Rocha et al., 2005; Saito et al., 2011; Graziano et al., 2013.

Galleria mellonella uma mariposa que têm a sua fase larval utilizada como modelo invertebrado para o estudo da interação patógeno/hospedeiro, pois pode ser mantida à temperatura semelhante à dos mamíferos (37°C), é de fácil manipulação, baixo custo e os resultados encontrados com relação aos fatores de virulência podem ser correlacionados àqueles realizados em modelos vertebrados. O sistema de defesa imunológica deste inseto apresenta ainda similaridades com o de animais vertebrados (Pereira et al., 2018).

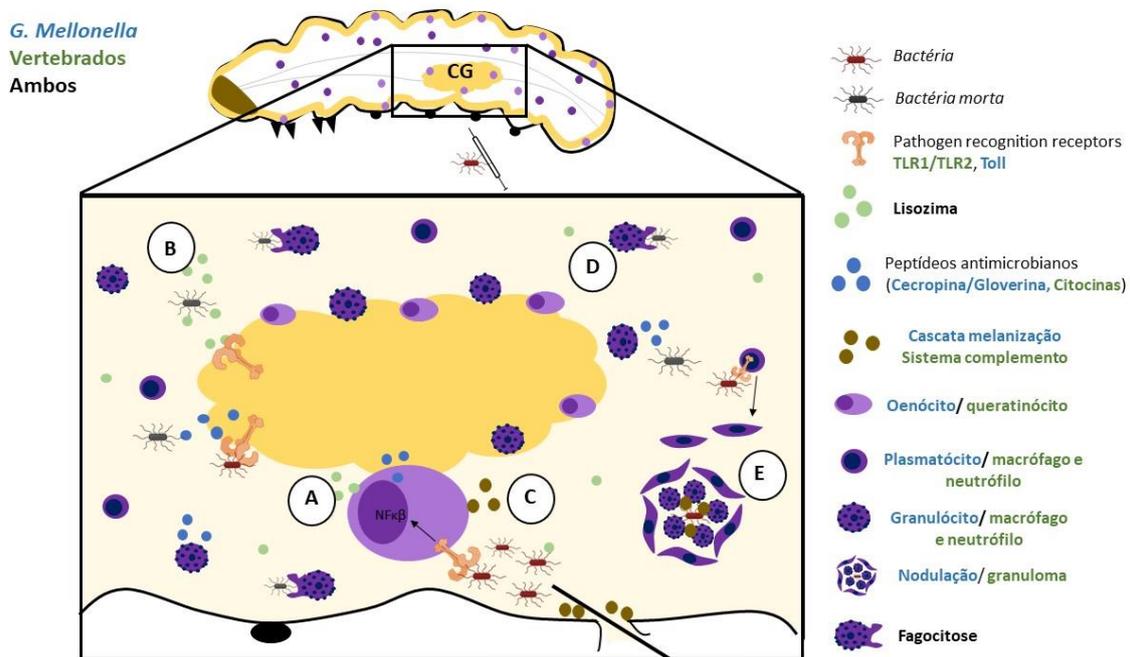
Após ser infectada, a larva inicia uma série de respostas que são divididas em humoral e celular. O patógeno e seus produtos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), interagem com receptores de reconhecimento de patógenos expressos na superfície de hemócitos e órgãos como o corpo gorduroso. Em *G. mellonella*, um dos principais receptores relacionados a resposta à bactéria é o Toll, correlato ao toll-like receptor (TLR)-2 e 4 encontrado em vertebrados. Após a estimulação dos receptores, haverá a estimulação do fator de transcrição nuclear kappa beta (Figura 4A), que leva a liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e lisozima. A lisozima também já se encontra circulando na hemolinfa e é capaz de degradar e matar os micro-organismos invasores (Figura 4B). Os AMPs equivalem às citocinas liberadas durante o processo inflamatório em vertebrados, e o principal AMP na resposta a bactérias gram-positivas e negativas é

a cecropina, que penetra na parede celular e forma poros na membrana citoplasmática resultando, em perda de íons, e conseqüentemente morte celular. As gloverinas se ligam ao LPS de bactérias gram-negativas e inibem a síntese de proteínas de membrana vitais resultando em permeabilidade da mesma.

Outro sistema ativado após injúria em insetos é a cascata de melanização, principalmente pela liberação da enzima fenoloxidase pelos hemócitos, que converte a tirosina hidroxilase em melanina. Este sistema irá auxiliar na coagulação e cicatrização dos tecidos além de opsonizar e formar complexos que são capazes de matar patógenos pela liberação de espécies reativas de oxigênio (Figura 4C). Nos vertebrados, a produção de melanina é feita pelos queratinócitos e tem como principal função a proteção dos raios UV; no entanto a função de opsonização e inativação de micro-organismos é desempenhada pelo sistema complemento. Além disso, os granulócitos, análogos aos neutrófilos/macrófagos em vertebrados, imediatamente após a infecção começarão a fagocitar as bactérias, na tentativa de conter a infecção (Figura 4D). Finalmente, após entrar em contato com o patógeno, os plasmatócitos se ativam, emitem pseudópodes e se agregam ao redor do patógeno, formando estruturas conhecidas como nódulos (Figura 4E). Os vertebrados têm uma resposta semelhante, os granulomas. (Nathan, 2014; Tsai et al., 2016; Wojda, 2017; Pereira et al., 2018).

Trabalhos prévios demonstram que *G. mellonella* é um modelo útil para o estudo da infecção por *P. gingivalis* (Gomes et al., 2016; Santos et al., 2017; Geraldo et al., 2020; Moman et al., 2020; Solbiati et al., 2020). As larvas produzem a octopamina (OCT), hormônio análogo à NE em vertebrados, como parte da resposta de fuga ou luta. Em insetos o valor basal de OCT é por volta de 4,5-5,6pg/ μ L (10-30nM) podendo chegar a 61pg/ μ L (300-540nM) em situações de estresse (Davenport, Evans, 1984; Dunphy, Downer, 1994; Adamo et al., 1995). Esse hormônio tem sido correlacionado a um aumento da susceptibilidade à infecção pós estresse, em insetos (Adamo et al., 2010).

Figura 4 – Esquema da resposta imune desencadeada em *G. mellonella* após infecção por micro-organismos e as respostas correlatas em vertebrados



Legenda: Após infecção, a larva inicia uma série de respostas que são divididas em humoral e celular. A ativação de receptores de superfície pelos patógenos (A), leva a liberação de peptídeos antimicrobianos e lisozima. A lisozima e os peptídeos antimicrobianos encontram-se circulantes na hemolinfa prontos para realizar a defesa (B). A ativação da cascata de melanização opsoniza e mata microrganismos (C). Além disso, os granulócitos/plasmatócitos, imediatamente após a infecção, começam a fagocitar as bactérias, na tentativa de conter a infecção (D), formando também estruturas conhecidas como nódulos (E). CG= corpo de gorduroso.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Trabalhos *in vitro* mostram a ação das catecolaminas em *P. gingivalis*, mas utilizam concentrações acima das fisiológicas ou encontradas no estado de estresse (Figura 3), e têm como limitação não apresentarem a correlação com o sistema imune. Assim, o estudo da resposta imunológica frente a diferentes concentrações de agonistas adrenérgicos (fisiológica, durante estresse e em condições patológicas como feocromocitoma) em *G. mellonella* e, como estas situações influenciariam a progressão da infecção por *P. gingivalis*, uma bactéria que se mostrou se beneficiar da NE *in vitro*, poderiam auxiliar no entendimento da susceptibilidade à infecção dos indivíduos expostos a este neurotransmissor, tanto pela ótica do sistema imune quanto da infecção pelo micro-organismo.

Assim os objetivos deste trabalho foram avaliar: (1) a inervação simpática no periodonto e a influência da ativação do SNS na vascularização periodontal e em

camundongos e (2) a influência do sistema adrenérgico nos fatores de virulência de *P. gingivalis* e na resposta imunológica a este patógeno *in vivo* (*G. mellonella*).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A doença periodontal faz parte do grupo das doenças complexas ou multifatoriais, que são decorrentes dos efeitos de múltiplos genes em combinação com estilo de vida e fatores ambientais. Na periodontite, a comunicação entre microbiota e hospedeiro determinará o desfecho da doença, e vários fatores podem influenciar na resposta do hospedeiro, incluindo o seu estado emocional.

O estresse é um fator de risco para doença periodontal (Genco et al., 2013), sendo o SNS um dos mecanismos acionados durante o estresse. Pouco se sabia sobre a inervação simpática na mandíbula, com estudos antigos onde era difícil a observação das fibras nervosas (Norevall et al., 1996). Aqui nós mostramos que as fibras simpáticas, marcadas por TH e NPY, encontram-se principalmente ao redor de vasos sanguíneos na região do ligamento periodontal, e eventualmente nos vasos sanguíneos do osso alveolar (Figura 5A). Nos ossos longos, fibras TH apresentam morfologia em “saca rolhas” e envolvem os vasos sanguíneos na região periosteal. Já no osso cortical, essas fibras são observadas exclusivamente nos canais de Havers (Chartier et al., 2018). As fibras simpáticas liberaram NE, que desencadeia seus efeitos ao se ligar aos receptores adrenérgicos. Confirmando a presença dessas fibras no periodonto, de modo similar aos ossos longos, e baseados nos nossos achados prévios de que a estimulação β -AR em osteoblastos induz angiogênese de ossos longos (Mulcrone et al., 2017), nós partimos para averiguar se essa ação também seria observada na região molar de camundongos. No entanto, diferentemente do que esperávamos, a estimulação β -AR por ISO não aumentou angiogênese em nenhuma das regiões estudadas (ligamento periodontal, osso alveolar e polpa dentária) nem influenciou a expressão de *Vegfa*, *Il-1 β* , *Il-6* e *Rankl*.

A resposta diferente observada entre mandíbula e tíbia pode ser devido às origens embrionárias distintas. Os ossos faciais se originam de células da crista neural através, predominantemente, de ossificação intramembranosa, enquanto o esqueleto axial origina-se da mesoderme, por ossificação endocondral (Couly et al., 1993). Foi demonstrado que osteoblastos originados da crista neural e do mesoderma apresentam potenciais osteogênicos distintos *in vitro* (Reichert et al., 2013). Os osteoblastos mandibulares depositam mais matriz mineralizada e expressam níveis mais elevados de fosfatase alcalina quando comparados aos osteoblastos da tíbia (Reichert et al., 2013). Além disso, diferentes envelopes ósseos (osso alveolar,

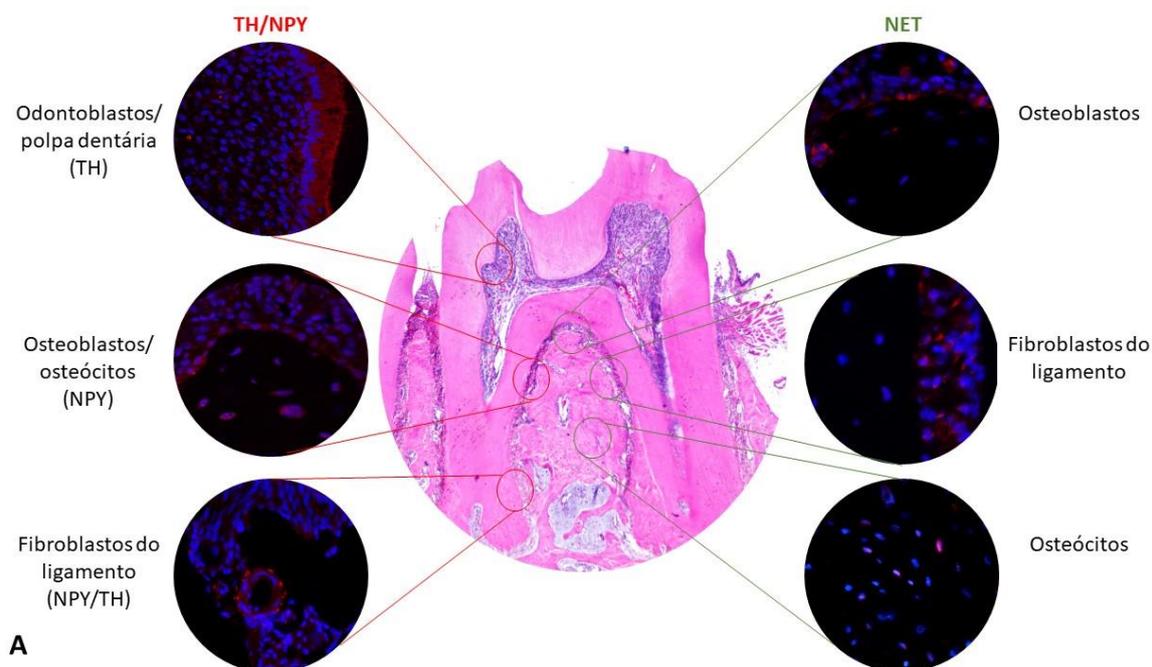
periósteo mandibular e região retromolar) respondem diferentemente a agonistas/antagonistas do sistema catecolaminérgico (Bataille et al., 2012). Uma maior expressão de VEGF observada em fêmures comparado à mandíbula, tanto em fetos quanto em adultos a nível molecular e proteico, também suporta mecanismos diferentes controlando a densidade vascular entre os dois tecidos (Marini et al., 2015).

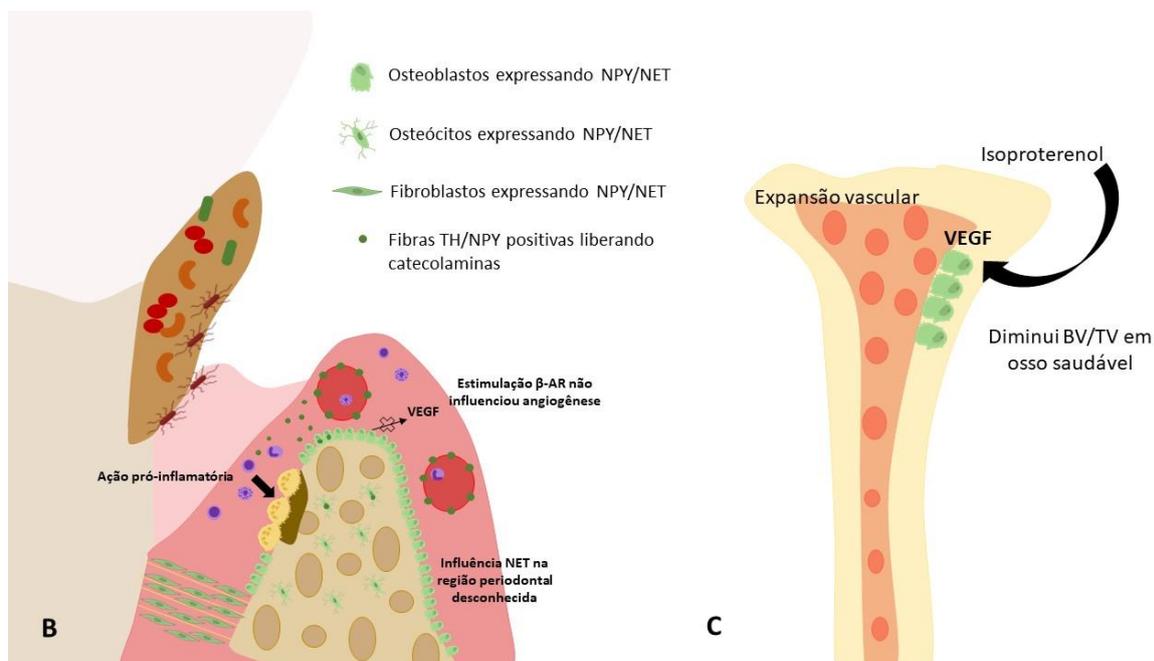
A expansão vascular na periodontite parece estar relacionada à gravidade da doença (Aspriello et al., 2009; Artese et al., 2010; Kasprzak et al., 2012; Vladau et al., 2016, Afacan et al., 2019). No entanto, o aumento da vascularização provavelmente está ligado ao agravamento da inflamação, uma vez que o efeito deletério da ativação do SNS na periodontite já tinha sido demonstrado na literatura através da sua influência na resposta imune (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012; Martins et al., 2017). O uso de propranolol (bloqueador β -AR) diminuiu os níveis séricos de proteína C-reativa, TNF- α e IL-6, reduzindo o número de osteoclastos em animais com periodontite (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012). Assim, a ação do SNS provavelmente ocorre devido à sua capacidade de orquestrar o processo inflamatório durante a doença periodontal. Foi constatado que o SNS interfere tanto na resposta imune inata quanto adaptativa, uma vez que a presença dos receptores α 1 e β 2 nestas células foi evidenciada. Na resposta imune inata, o α 1-AR está relacionado à estimulação do processo inflamatório, enquanto o β 2-AR estimula uma ação anti-inflamatória. Já na resposta imune adaptativa o β 2-AR é praticamente o único receptor encontrado nos linfócitos (Bellinger, Lorton, 2014; Scanzano, Cosentino, 2015). Outro achado que corrobora a noção de que o SNS influencia a periodontite através do sistema imune é que a administração de ISO ou propranolol em osso alveolar saudável não influencia o número de osteoclastos (Bataille et al., 2012).

A exposição contínua dos tecidos à NE deve ser controlada, para evitar ativação exacerbada e repor os reservatórios de NE nas fibras nervosas. Essa função é desempenhada pelos NETs, importante mecanismo de *feedback* negativo que limita a resposta simpática (Mandela, Ordway, 2006). Neste estudo, nós identificamos pela primeira vez a presença de NET através de imunofluorescência em fibroblastos periodontais e osteoblastos/osteócitos do osso alveolar (Figura 5A). Essa expressão foi aumentada em comparação com ossos longos, o que sugere que o periodonto apresenta mecanismos para limitar os efeitos do estresse e da ativação simpática. A inervação simpática é essencial para a erupção contínua dos incisivos de roedores e simpatectomia foi relacionada a alterações de densidade óssea, mostrando que o

SNS é importante para a homeostase dos tecidos periodontais em roedores e que a sua ação deve ser estritamente controlada (Boggio et al., 2004). A relevância desses achados deverá ser explorada em estudos futuros utilizando inibidores seletivos do NET, como a reboxetina, ou animais geneticamente modificados com deleção seletiva de *Net*, para averiguar a sua funcionalidade durante a patogênese da doença periodontal (Figura 5B, 5C).

Figura 5 - Esquema sumarizando os achados da primeira parte deste estudo e questões a serem elucidadas





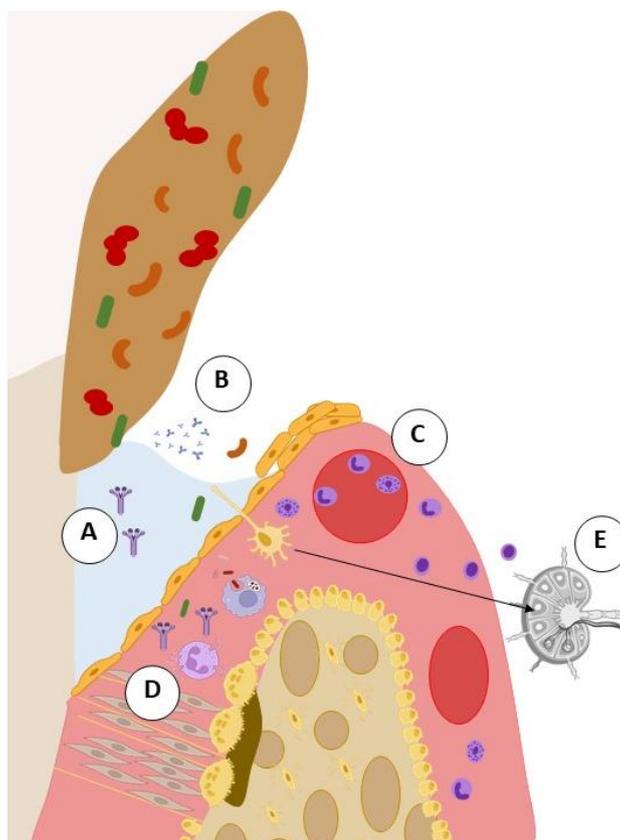
Legenda: A) Fibras nervosas marcadas para TH e NPY foram encontradas ao redor dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal e nos canais de Havers no osso alveolar. Além disso também se notou marcação para TH em odontoblastos e fibroblastos do ligamento, além de marcação NPY em osteoblastos e osteócitos. NET foi encontrado em osteoblastos, osteócitos e fibroblastos do ligamento periodontal. B) A liberação das catecolaminas na região periodontal influenciaria as células da região através da ligação com receptores adrenérgicos. A estimulação do receptor β -AR, por ISO, não alterou a MVD da região. Além disso, a presença maior de NET na região periodontal poderia controlar a ação das catecolaminas nesta região, sendo que a sua funcionalidade na patogênese da periodontite deve ser elucidada em estudos futuros. No entanto, estudos *in vivo* demonstram a ação dos β -AR na patogênese da doença periodontal aumentado reabsorção óssea, provavelmente devido a ação pró-inflamatória, uma vez que o seu bloqueador (propranolol) diminui a liberação de citocinas (Rodrigues et al., 2012; Okada et al., 2010; Martins et al., 2017). C) Nos ossos longos, a administração de ISO aumentou a MVD (Mulcrone et al., 2017), mostrando comportamento distinto aos ossos mandibulares. Reforçando essas diferenças, administração de ISO em fêmur saudável influencia BV/TV, o que não ocorre nos ossos alveolares (Bataille et al., 2012).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Como enfatizado anteriormente, o sistema imune é parte essencial da patogênese da doença periodontal. Porém, a complexidade da doença dificulta o estudo da interação dos ligantes adrenérgicos na resposta imune isoladamente. Ainda, a ação desses ligantes diretamente nos periodontopatógenos foi apenas estudada *in vitro*, e a importância desses achados no cenário *in vivo* necessita de validação. Assim, em nosso estudo utilizamos o modelo de *G. mellonella*, devido à similaridade da sua resposta imune inata aos vertebrados e por permitir a infecção controlada por *P. gingivalis*.

A resposta imune inata é parte fundamental na manutenção da homeostase dos tecidos periodontais. Imunoglobulinas A (IgA) e peptídeos antimicrobianos presentes na saliva, assim como fatores do sistema complemento, ligam-se aos microorganismos facilitando a fagocitose ou inativando-os diretamente, controlando assim

a população microbiana subgengival. Além disso, uma vez que os micro-organismos entram em contato com os receptores de reconhecimento de patógenos, principalmente os *Toll-like* expressos nas células epiteliais da gengiva, células dendríticas, fibroblastos e macrófagos da região, há a liberação de citocinas específicas que promovem a quimiotaxia de leucócitos, como neutrófilos e macrófagos, para o periodonto. No entanto, durante o processo de fagocitose há a liberação de radicais livres e enzimas que levam à degradação tecidual. Finalmente, a estimulação das células dendríticas leva ao recrutamento e ativação de linfócitos, nos linfonodos, iniciando a resposta imune adaptativa. Entretanto, ao fagocitarem os agentes agressores, os polimorfonucleares também ativam vias resolutivas da inflamação que finalizam o processo inflamatório. Em pacientes com resposta adequada ao biofilme dental, a resposta imune inata será eficaz em conter o ataque microbiano, e o quadro de gengivite não evoluirá para doença periodontal. Entretanto, se houver uma super ativação do processo inflamatório, haverá evolução para periodontite (Figura 6).

Figura 6 – Desenho esquemático de um dente e do periodonto associado, evidenciando a resposta imune inata no periodonto

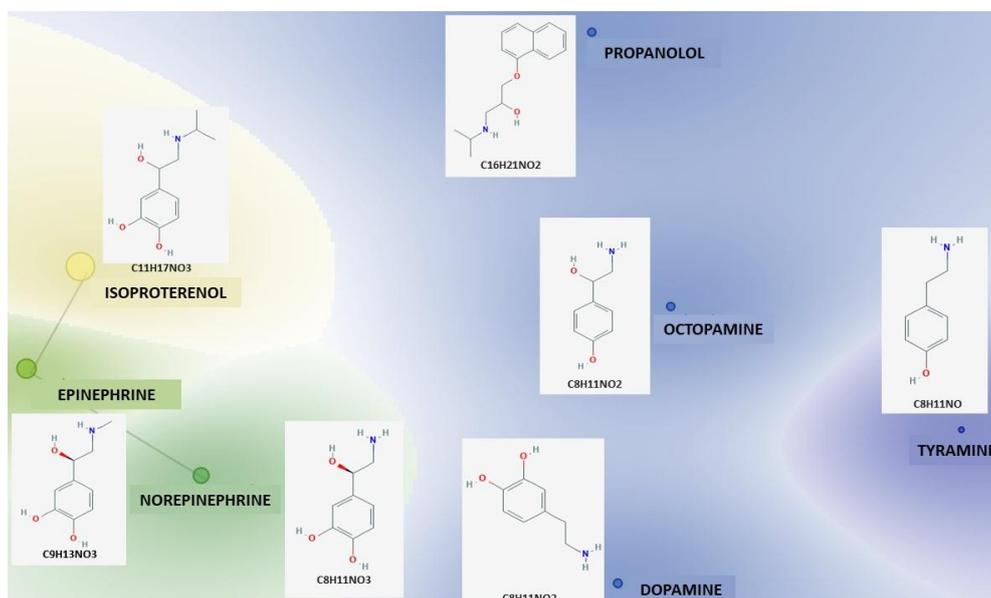


Legenda: O periodonto apresenta um sistema de proteção contra a ameaça constante do meio externo, representada principalmente pelo biofilme dental. Para tal, Imunoglobulinas A (IgA) e peptídeos antimicrobianos presentes na saliva, assim como fatores do sistema complemento, ligam-se aos micro-organismos facilitando a fagocitose ou inativando-os diretamente, controlando assim a população microbiana subgengival (A, B), além da barreira física constituída pela gengiva. Os microrganismos ativam receptores expressos nas células epiteliais da gengiva, células dendríticas, fibroblastos e macrófagos da região, que liberam citocinas específicas que promovem a quimiotaxia de leucócitos, como neutrófilos e macrófagos, para o periodonto (C), que irão fagocitar os agentes agressores (D). Ainda, a estimulação das células dendríticas leva ao recrutamento e ativação de linfócitos, nos linfonodos, iniciando a resposta imune adaptativa (E). O sucesso desta resposta em conter o ataque microbiano e cessar a inflamação impedirá a progressão do quadro de gengivite, caracterizado pela inflamação do periodonto sem perda de inserção, para o quadro de periodontite, onde há a perda irreversível dos tecidos de suporte dos dentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em *G. mellonella*, os hemócitos são correlatos aos neutrófilos e macrófagos de vertebrados, desempenhando o papel de fagocitar e liberar fatores da resposta humoral que orquestram o processo inflamatório. Assim, para investigar a influência do sistema adrenérgico na resposta imune da larva, nós utilizamos ISO, um agonista β -adrenérgico e NE, que se liga aos receptores α e β adrenérgicos, mas com predileção pelo α -AR. A influência desses hormônios foi correlacionada com a OCT, hormônio endógeno do inseto que apresenta estrutura química semelhante à NE (Adamo, 2008; Figura 7).

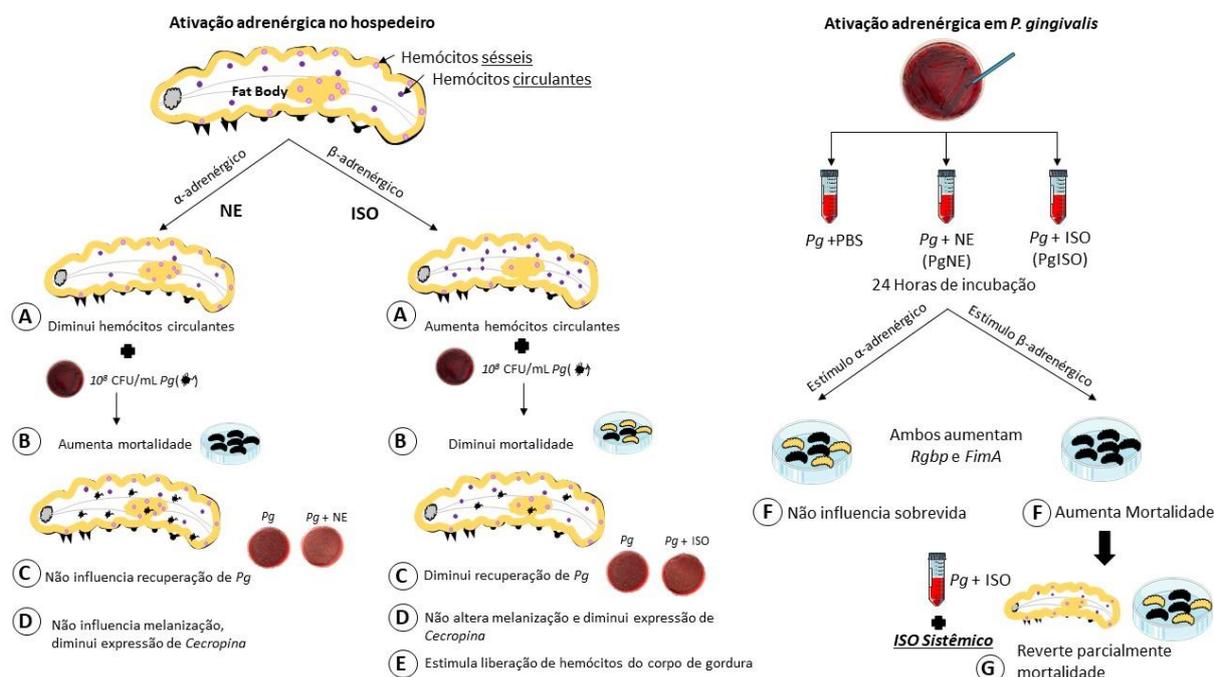
Figura 7 - Jaccard Index dos compostos utilizados neste estudo



Legenda: Representação da similaridade entre as estruturas químicas dos compostos do sistema adrenérgico/octopaminérgico. Nota-se que ISO, epinefrina e NE são semelhantes entre si, estando dentro do mesmo cluster. Os clusters são representados pelas cores verde, amarelo, azul e roxo.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Após constatar que nenhum dos compostos foi tóxico para a larva, nós validamos o uso destes compostos para estudar resposta adrenérgica em *G. mellonella*. A literatura acerca da influência da OCT na densidade hemocitária é controversa, mostrando ações antagônicas dependendo da concentração utilizada. As doses fisiológicas (100pM-1nM; Davenport, Evans, 1984) comportaram-se como ISO, mostrando uma resposta semelhante à β -adrenérgica, e aumentando o número de hemócitos circulantes. O SNS em vertebrados também mobiliza as células inflamatórias para o local da agressão através do receptor β -AR (Bellinger, Lorton, 2014). Já as doses mais altas, que representam estado de estresse (1 μ M; Dunphy, Downer, 1994), influenciaram negativamente a contagem de hemócitos, semelhante a NE, ligante preferencial do receptor α -AR (Figura 8 A). A dualidade de ações dos ligantes nos hemócitos se traduziu na análise de curva de sobrevivência. Enquanto ISO protegeu as larvas da infecção por *P. gingivalis*, NE aumentou a mortalidade (Figura 8B).

Figura 8 – Resumo esquemático dos achados da segunda parte desta tese



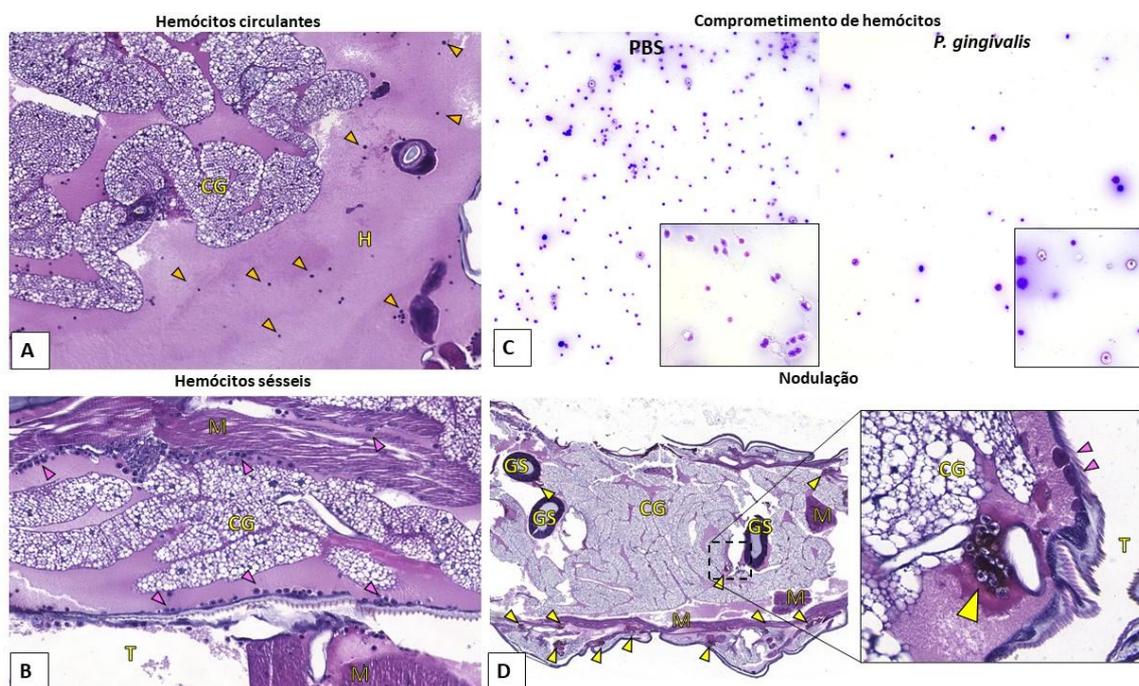
Legenda: Na resposta sistêmica do hospedeiro, ISO e NE tiveram ações antagônicas na resposta celular (A), sendo que NE diminuiu a densidade hemocitária, enquanto ISO aumentou. Isso se traduziu na sobrevida (B) e recuperação de *P. gingivalis* da hemolinfa (C). Na resposta humoral, ambos ligantes diminuíram a expressão de *cecropina*, mas não influenciaram na melanização (D). O aumento de hemócitos causado pelo ISO foi devido à mobilização dos hemócitos aderidos ao corpo de gordura (E). Quanto à ação direta dos compostos em *P. gingivalis*, após 24 horas da incubação, embora ambos tenham aumentado a expressão de *rgbp* e *fimA*, apenas PgISO aumentou a mortalidade das larvas (F). No entanto, a co-administração de ISO sistêmico foi capaz de reverter parcialmente o fenótipo causado pela bactéria com virulência aumentada (G).

Fonte: Elaborada pelo autor.

G. mellonella apresenta hemócitos que podem ser sésseis ou circulantes. Os sésseis encontram-se aderidos aos órgãos internos da larva, como o corpo de gordura. Já os circulantes encontram-se livremente na hemolinfa (King et al., 2013). Frente a estímulos, os hemócitos são mobilizados para a hemolinfa para proteger o hospedeiro. No caso de infecção, os hemócitos fagocitam os agentes agressores, entrando então em processo de apoptose, além de formarem os nódulos, estruturas que visam conter a disseminação dos micro-organismos e inativá-los. Em geral, os nódulos se fixam nos órgãos internos, o que juntamente com a apoptose de hemócitos, diminui o número de células circulantes (Figura 9A-D). Aqui, observamos a diminuição do número de hemócitos causada por *P. gingivalis*, e esta foi revertida pela administração de ISO. Esse aumento no número de hemócitos circulantes foi β-específico, uma vez que a administração de propranolol preveniu a mobilização de

hemócitos do corpo de gordura (Figura 8E), tanto para ISO quanto para OCT. Além disso, a diminuição na recuperação de *P. gingivalis* na hemolinfa dos animais (Figura 8C) sugere um aumento da sua atividade.

Figura 9 - Classificação anatômica dos hemócitos e influência da infecção por *P. gingivalis* nestas células



Legenda: Hemócitos circulantes (cabeça de seta amarela) são aqueles que se encontram livremente na hemolinfa (A); enquanto os sésseis (cabeça de seta rosa) estão aderidos aos órgãos internos da larva (B). Frente à infecção por *P. gingivalis* há redução do número de hemócitos circulantes (C), que pode ser devido à apoptose ou pela formação de nódulos (cabeça de seta amarela) que ficam aderidos aos órgãos internos da larva (D). M= músculos, CG= corpo de gordura, T = traqueia, GS= glândula da seda, H= hemolinfa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A ação do sistema octopaminérgico na resposta celular de insetos vêm sendo estudado. Baixas concentrações de OCT promoveram adesão de hemócitos e fagocitose, enquanto altas concentrações de OCT inibiram adesão de hemócitos e fagocitose (Huang et al., 2012). Outros autores observaram que o bloqueio β -AR aboliu alterações causadas pela OCT (5×10^{-6} M) na mobilidade de plasmatócitos e filopódia produzida pelos granulócitos (Diehl-Jones et al., 1996). OCT (10^{-6} M) aumentou a fagocitose *in vitro*, e a sobrevivência após infecção por *Staphylococcus aureus* (Baines, Downer, 1992)

Neste trabalho, investigamos a ação aguda dos ligantes na infecção por *P. gingivalis*, devido à sua ação extremamente rápida (30 min), e podemos observar claramente que a ativação β -AR durante as fases iniciais da infecção preveniu a morte das larvas. Foi demonstrado, *in vitro*, que a ativação β 2-AR (utilizando Salmeterol) inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico causadas por *P. gingivalis*. Assim foi sugerido que o Salmeterol pode ser efetivo para controlar a resposta inflamatória gerada pelos receptores TLR (Sharma et al., 2017). Ainda a estimulação β -AR (com ISO) aumentou o potencial fagocítico de macrófagos (Muthu et al., 2010; Kim et al., 2019) e estimulou o perfil M2 (Lamkim et al., 2016) relacionado à resolução da doença periodontal (Wang et al., 2021a) assim como os níveis de resolvina (Shi et al., 2017), que já mostrou ser efetiva na prevenção de periodontite em roedores (Mizraji et al., 2018; El Khol et al., 2018)

Ainda, a sinalização α -AR foi apontada como a mais relevante no desenvolvimento da periodontite, uma vez que a administração de fentolamina (bloqueador α -AR) inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias na gengiva de ratos com periodontite crônica e que foram estressados, o que não ocorreu com propranolol (Liu et al., 2012). Esses achados corroboram nossa observação que a administração de NE aumentou a mortalidade das larvas.

Nós avaliamos a influência do sistema adrenérgico na resposta humoral contra *P. gingivalis*, uma vez que esta resposta representa a linha de frente na defesa dos insetos contra infecção, com a presença de lisozima e fenoloxidase na hemolinfa assim como a produção de AMP pelos hemócitos. Não observamos influência dos compostos na melanização, porém, ambos diminuíram a expressão de *cecropina*, o que pode ser explicado de diferentes maneiras (Figura 8D). O equilíbrio entre resposta inflamatória controlada e exacerbada é o que determina a sepse e a sobrevivência do

animal, da mesma forma que é a inflamação descontrolada que leva à perda óssea decorrente da periodontite. O reconhecimento de moléculas estranhas (LPS) pelos hemócitos e tecidos da larva (corpo de gordura) ou a sua comunicação com fatores humorais que se ligam e opsonizam os invasores (melanina) vão desencadear eventos intracelulares e intercelulares que coordenam as respostas efetoras da inflamação, como fagocitose e nodulação (Lavine, Strand, 2002). No caso do ISO, houve uma diminuição da carga bacteriana na hemolinfa dos animais (Figura 8C), o que pode ter ocorrido por fagocitose aumentada, levando à diminuição da ativação de outros fatores como os peptídeos antimicrobianos. Já no caso da NE, havia um menor número de hemócitos circulantes, que não controlaram a invasão ou ativaram os AMPs, o que possivelmente resultou na morte acelerada das larvas. Ainda, outros efeitos humorais não explorados nesta pesquisa podem ser mais determinantes na progressão da infecção por *P. gingivalis*.

Finalmente, o modelo de *G. mellonella* mostrou-se excelente para traduzir os achados *in vitro* para o contexto *in vivo*, respeitando o princípio dos 3R, de redução, substituição e refinamento dos estudos com animais. Tanto ISO quanto NE aumentaram a virulência de *P. gingivalis* (Figura 8F) como já havia sido descrito anteriormente na literatura (Saito et al., 2011; Graziano et al., 2013; Boyanova et al., 2017). Entretanto, apenas ISO aumentou a mortalidade das larvas. A diferença na resposta biológica causada na larva pode ser devido à influência de ISO em outros fatores de virulência que provavelmente são mais determinantes na severidade da infecção por *P. gingivalis* em *G. mellonella*. Ainda, em estudo prévio, *P. gingivalis* mostrou ter receptor similar ao β -AR, uma vez que o aumento na sua virulência foi parcialmente bloqueado pela administração de propranolol, o que pode ter influenciado na resposta da bactéria (Saito et al., 2011). Esses achados também enfatizam a necessidade de validação de observações *in vitro* no cenário *in vivo*, pois o aumento da virulência causado por NE, que já havia sido descrito *in vitro*, não foi suficiente para que observássemos um fenótipo diferente nas larvas. Nós comprovamos que a ação da resposta imune é superior à ação bacteriana direta, uma vez que a administração sistêmica de ISO reduziu a mortalidade causada pela bactéria mais virulenta. Na verdade, a presença de *P. gingivalis* apenas não é relacionada a formas de periodontite em humanos (Nibali et al., 2012; Nędzi-Góra et al., 2020).

O estresse influencia a periodontite por vários mecanismos, entre eles o sistema adrenérgico. A ativação dos receptores adrenérgicos (α e β) altera os dois

pilares da doença periodontal: o hospedeiro e a microbiota. No entanto, qual o peso desta influência em cada pilar, ainda é desconhecido. Nesta tese, observamos que a influência do SNS na resposta imune do hospedeiro parece sobrepor a influência desse sistema em outros fatores associados à periodontite, uma vez que a ativação β -AR em osso alveolar saudável não alterou a produção de citocinas inflamatórias, osteoclastogênese ou microvasculatura. Além disso, a modulação adrenérgica da resposta imune de *G. mellonella* foi determinante para o desfecho da infecção por *P. gingivalis*, mesmo quando esta apresentava virulência aumentada.

REFERÊNCIAS

American Board of internal medicine Laboratory [Internet]. Philadelphia (PA): ABIM. [cited 2021 Nov 27]. Available from: <https://www.abim.org/~media/ABIM%20Public/Files/pdf/exam/laboratory-reference-ranges.pdf>.

Adamo SA, Linn CE, Hoy RR. The role of neurohormonal octopamine during 'fight or flight' behavior in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Exp Biol*. 1995;198 (Pt 8):1691-700. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.8.1691>.

Adamo SA. Norepinephrine and octopamine: linking stress and immune function across phyla. *Invertebrate Surviv J*. 2008;5(1):12-9.

Adamo SA. Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain Behav Immun*. 2010 Feb;24(2):194-200. doi: 10.1016/j.bbi.2009.08.003. Epub 2009 Aug 11. PMID: 19679179.

Afacan B, Öztürk V Ö, Paşalı Ç, Bozkurt E, Köse T, Emingil G. Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 α , VEGF, and TNF- α levels in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2019 Jul;90(7):788-97. doi: 10.1002/JPER.18-0412.

Antonova IN. Changes in the masticatory muscles, periodontal tissues, and the pharyngeal ring in wistar rats in chronic psychophysical stress. *Neurosci Behav Physiol*. 2008;38(9):891–6. doi: 10.1007/s11055-008-9068-4.

Artese L, Piattelli A, de Gouveia Cardoso LA, Ferrari DS, Onuma T, Piccirilli M, et al. Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81(5):718–26. doi: 10.1902/jop.2010.090524.

Aspriello SD, Zizzi A, Lucarini G, Rubini C, Faloia E, Boscaro M, et al. Vascular endothelial growth factor and microvessel density in periodontitis patients with and

without diabetes. J Periodontol. 2009 Nov;80(11):1783–9. doi: 10.1902/jop.2009.090239.

Baines D, Downer RGH. Octopamine and 5hydroxytryptamine enhance the phagocytic and nodule formation activities of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes. J Insect Physiol. 1992;38(11):905-14.

Bataille C, Mauprivez C, Haÿ E, Baroukh B, Brun A, Chaussain C, et al. Different sympathetic pathways control the metabolism of distinct bone envelopes. Bone. 2012;50(5):1162–72.

Bao J-Y, Huang Y, Wang F, Peng Y-P, Qiu Y-H. Expression of alpha-AR subtypes in T lymphocytes and role of the alpha-ARs in mediating modulation of T cell function. Neuroimmunomodulation. 2007;14(6):344–53. doi: 10.1159/000129670.

Belay T, Sonnenfeld G. Differential effects of catecholamines on *in vitro* growth of pathogenic bacteria. Life Sci. 2002;71(4):447–56. doi: 10.1016/s0024-3205(02)01683-1.

Belay T, Aviles H, Vance M, Fountain K, Sonnenfeld G. Catecholamines and *in vitro* growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. Life Sci. 2003;73(12):1527–35. doi: 10.1016/S0024-3205(03)00472-7.

Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. J Periodontol. 2018 June; 89(Suppl 1): S140–S158. doi: 10.1002/JPER.17-0670.

Boggio V, Ladizesky M G, Cutrera R A, Cardinali D P. Autonomic neural signals in bone: physiological implications for mandible and dental growth. Life Sci. 2004 11;75(4):383-95. doi: 10.1016/j.lfs.2003.11.031.

Boyanova L. Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria. Anaerobe. 2017 Apr; 44:13–9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.01.003.

Brooks CL, Dunphy GB. Protein kinase A affects *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) larval haemocyte non-self responses. *Immunol Cell Biol.* 2005 Apr;83(2):150-9. doi: 10.1111/j.1440-1711.2005.01316.x. PMID: 15748211.

Calcagni E, Elenkov I. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann NY Acad Sci.* 2006 Jun 1;1069(1):62–76. doi: 10.1196/annals.1351.006.

Chartier SR, Mitchell SAT, Majuta LA, Mantyh PW. The changing sensory and sympathetic innervation of the young, adult and aging mouse femur. *Neuroscience.* 2018 Sep 1;387:178-90. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.047.

Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009 Jul;5(7):374-81. doi: 10.1038/nrendo.2009.106. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19488073.

Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development.* 1993;117(2):409-29. <https://doi.org/10.1242/dev.117.2.409>

Davenport AP, Evans PD. Stress-induced changes in the octopamine levels of insect haemolymph. *Insect Biochemistry.* 1984;14(2):135-43. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90021-0).

Deinzer R, Förster P, Fuck L, Herforth A, Stiller-Winkler R, Idel H. Increase of crevicular interleukin 1beta under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *J Clin Periodontol.* 1999;26(1):1–8. doi: 10.1034/j.1600-051x.1999.260101.x

Deinzer R, Kottmann W, Förster P, Herforth A, Stiller-Winkler R, Idel H. After-effects of stress on crevicular interleukin-1beta. *J Clin Periodontol.* 2000;27(1):74–7. doi:10.1034/j.1600-051x.2000.027001074.x.

Diehl-jones WL, Mandato CA, Whent G, Downer RGH. Monoaminergic regulation of hemocyte activity. *J insect Physiol.* 1996;42(1):13-19. doi: 10.1016/0022-1910(95)00078-x

Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem*. 2004 Dec;91(5):1025-43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02797.x. PMID: 15569247.

Dunphy GR, Downer RGH. Octopamine, a modulator of the haemocytic nodulation response of non-immune *Galleria mellonella* larvae. *J Insect Physiol*. 1994; 40(3):267-72. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90050-7).

Eke PI, Wei L, Thornton-Evans GO, Borrell LN, Borgnakke WS, Dye B, et al. Risk indicators for periodontitis in US adults: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2016;87(10):1174-85. doi: 10.1902/jop.2016.160013.

El Kholy K, Freire M, Chen T, Van Dyke TE. Resolvin E1 promotes bone preservation under inflammatory conditions. *Front Immunol*. 2018 Jun 12;9:1300. doi: 10.3389/fimmu.2018.01300. ECollection 2018.

Elefteriou F. Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Oct 29;62(19–20):2339–49. doi: 10.1007/s00018-005-5175-3.

Elefteriou F. Impact of the autonomic nervous system on the skeleton. *Physiol Rev*. 2018;98(3):1083-112. doi: 10.1152/physrev.00014.2017.

Fiorillo L, Cervino G, Laino L, D'Amico C, Mauceri R, Tozum TF, et al. *Porphyromonas gingivalis*, periodontal and systemic implications: a systematic review. *Dent J (Basel)*. 2019 Dec 11;7(4):114. doi: 10.3390/dj7040114. PMID: 31835888; PMCID: PMC6960968.

Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci*. 2002 Apr;110(2):125-9. doi: 10.1034/j.1600-0722.2002.11153.x. PMID: 12013555.

Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol*. 1999 Jul;70(7):711-23. doi: 10.1902/jop.1999.70.1.100.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):59-94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>.

Geraldo BMC, Batalha MN, Milhan NVM, Rossoni RD, Scorzoni L, Anbinder AL. Heat-killed *Lactobacillus reuteri* and cell-free culture supernatant have similar effects to viable probiotics during interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2020;55(2):215-20. doi: 10.1111/jre.12704.

Gibbins I. Functional organization of autonomic neural pathways. *Organogenesis*. 2013;9(3):169–75. doi: 10.4161/org.25126.

Gomes LAP, Figueiredo LMA, Palma ALR, Geraldo BMC, Castro KCI, Fugisaki LRO, et al. *Punica granatum L.* (Pomegranate) extract: *in vivo* study of antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* model. *Sci World J*. 2016;8626987. doi: 10.1155/2016/8626987.

Goyal S, Jajoo S, Nagappa G, Rao G. Estimation of relationship between psychosocial stress and periodontal status using serum cortisol level: a clinico-biochemical study. *Indian J Dent Res*. 2011;22(1):6–9. doi: 10.4103/0970-9290.79966.

Graziano TS, Closs P, Poppi T, Franco GCN, Cortelli JR, Groppo FC, et al. Catecholamines promote the expression of virulence and oxidative stress genes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2014;49(5):660-9. doi: 10.1111/jre.12148.

Gruber R, Leimer M, Fischer MB, Agis H. Beta2-adrenergic receptor agonists reduce proliferation but not protein synthesis of periodontal fibroblasts stimulated with platelet-derived growth factor-BB. *Arch. Oral Biol*. 2013;58(12):1812–7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.09.005.

Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014 Jan;35(1):3-11. doi: 10.1016/j.it.2013.09.001.

Hering D, Lachowska K, Schlaich M. Role of the sympathetic nervous system in stress-mediated cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17:80. doi: 10.1007/s11906-015-0594-5.

Kasprzak A, Surdacka A, Tomczak M, Przybyszewska W, Seraszek-Jaros A, Malkowska-Lanzafame A, et al. Expression of angiogenesis-stimulating factors (VEGF, CD31, CD105) and angiogenetic index in gingivae of patients with chronic periodontitis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012;50(4):554-64. doi: 10.5603/20324.

Kim T-H, Ly C, Christodoulides A, Nowell CJ, Gunning PW, Sloan EK, et al. Stress hormone signaling through β -adrenergic receptors regulates macrophage mechanotype and function. *FASEB J.* 2019 Mar;33(3):3997–4006. doi: 10.1096/fj.201801429RR

King JG, Hillyer JF. Spatial and temporal *in vivo* analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biol.* 2013 30;11:55. doi:10.1186/1741-7007-11-55

Lamkin DM, Ho H-Y, Ong TH, Kawanishi CK, Stoffers VL, Ahlawat N, et al. β -Adrenergic-stimulated macrophages: Comprehensive localization in the M1-M2 spectrum. *Brain Behav Immun.* 2016 Oct;57:338-46. doi: 10.1016/j.bbi.2016.07.162.

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via α 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med.* 2014;46(10):e118. Doi: 10.1038/emm.2014.65.

Lyte M. The role of catecholamines in gram-negative sepsis. *Med Hypotheses* 1992;37:255–58. doi: 10.1016/0306-9877(92)90197-k.

Ma Y, Krueger JJ, Redmon SN, Uppuganti S, Nyman JS, Hahn MK, et al. Extracellular norepinephrine clearance by the norepinephrine transporter is required for skeletal homeostasis. *J Biol Chem.* 2013;288(42):30105–13.

Mandela P, Ordway G A. The norepinephrine transporter and its regulation. *Neurochem.* 2006;97(2):310-33. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03717.x.

Marini M, Bertolai R, Ambrosini S, Sarchielli E, Vannelli GB, Sgambati E. Differential expression of vascular endothelial growth factor in human fetal skeletal site-specific tissues: Mandible versus femur. *Acta Histochem.* 2015;117(3):228–34.

Martins LG, Spreafico CS, Tanobe PG, Tavares TAA, Castro ML, Franco GCN, et al. Influence of adrenergic neuromodulation during induction of periodontitis in rats. *International Academy of Periodontology. J Int Acad Periodontol.* 2017 Jul 1;19(3):80-88.

Memmert S, Damanaki A, Nogueira AVB, Nokhbehshaim M, Götz W, Cirelli JA, et al. Regulation of tyrosine hydroxylase in periodontal fibroblasts and tissues by obesity-associated stimuli. *Cell Tissue Res.* 2019 Mar;375(3):619-28. doi: 10.1007/s00441-018-2941-8. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30361782.

Mizraji G, Heyman O, Van Dyke TE, Wilensky A. Resolvin D2 restrains Th1 immunity and prevents alveolar bone loss in murine periodontitis. *Front Immunol.* 2018 Apr 25; 9:785. doi: 10.3389/fimmu.2018.00785. eCollection 2018.

Moman R, O'Neill CA, Ledder R G, Cheesapcharoen T, McBain A J. Mitigation of the toxic effects of periodontal pathogens by candidate probiotics in oral keratinocytes, and in an invertebrate model. *Front Microbiol.* 2020;11:999. doi: 10.3389/fmicb.2020.00999.

Mulcrone PL, Campbell JP, Clément-Demange L, Anbinder AL, Merkel AR, Brekken RA, et al. Skeletal colonization by breast cancer cells is stimulated by an osteoblast and β 2AR-dependent neo-angiogenic switch. *J. Bone Miner Res.* 2017a Jul;32(7):1442–54. doi: 10.1002/jbmr.3133.

Muthu K, He L-K, Szilagyi A, Strotmon P, Gamelli R L, Shankar R. β -adrenergic stimulation increases macrophage CD14 expression and *E. coli* phagocytosis through PKA signaling mechanisms. *J Leukoc Biol.* 2010 Oct;88(4):715-24. doi: 10.1189/jlb.0410186. Epub 2010 Jul 19.

Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T, et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontal Res.* 2006;41(6):527–34. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00901.x.

Nathan S. New to *Galleria mellonella*: Modeling an ExPEC infection. *Virulence.* 2014;5(3):371-4.doi:10.4161/viru.28338.

Nędzi-Góra Ma, Górski R, Górski B. Is the progression rate of periodontitis related to subgingival biofilm composition or gingival crevicular fluid IL-1 β and MMP-8 concentrations? *Cent Eur J Immunol.* 2020;45(4):425-32. doi: 10.5114/ceji.2020.101256.

Nibali L, D'Aiuto F, Ready D, Parkar M, Yahaya R, Donos N. No association between *A actinomycetemcomitans* or *P gingivalis* and chronic or aggressive periodontitis diagnosis. *Quintessence Int.* 2012 Mar;43(3):247-54

Norevall LI, Matsson L, Forsgren S. 5-Hydroxytryptamine immunoreactivity is detectable in sympathetic nerve fibres in rat oral tissues. *Histochem. J.* 1996 Jul;28(7):485–93.

Okada Y, Hamada N, Kim Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Ozono SS. Blockade of sympathetic β -receptors inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. *Arch Oral Biol.* 2010 Jul 1;55(7):502–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.04.002.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-Implant diseases and conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.

Pereira TC, de Barros PP, Fugisaki LRO, Rossoni RD, Ribeiro FC, de Menezes RT, et al. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J Fungi (Basel).* 2018;4(4):128. doi:10.3390/jof4040128.

Pešić V, Kosec D, Radojević K, Pilipović I, Perišić M, Vidić-Danković B, et al. Expression of α 1-adrenoceptors on thymic cells and their role in fine tuning of thymopoiesis. *J. Neuroimmunol.* 2009 Sep 29;214(1–2):55–66. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.06.018.

Rai B, Kaur J, Anand SC, Jacobs R. Salivary stress markers, stress, and periodontitis: A Pilot Study. *J Periodontol.* 2011;82(2):287–92. doi: 10.1902/jop.2010.100319.

Reichert JC, Gohlke J, Friis TE, Quent VMC, Hutmacher DW. Mesodermal and neural crest derived ovine tibial and mandibular osteoblasts display distinct molecular differences. *Gene.* 2013;525(1):99–106.

Ricci A, Bronzetti E, Conterno A, Greco S, Mulatero P, Schena M, et al. alpha1-adrenergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *Hypertens.* 1999 Feb;33(2):708–12. doi: 10.1161/01.HYP.33.2.708.

Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PPE, Williams PH, Chapple ILC. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(5):296–303. doi: 10.1034/j.1399-302X.2002.170506.x.

Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PPE, Williams PH, Chapple ILC. Stress and the periodontal diseases: Growth responses of periodontal bacteria to *Escherichia coli* stress-associated autoinducer and exogenous Fe. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(3):147–53. doi: 10.1111/j.1399-302X.2004.00196.x.

Rocha MF, Tauzin-fin P, Vasconcelos PL, Ballanger P. Assessment of serum catecholamine concentrations in patients with pheochromocytoma undergoing video laparoscopic adrenalectomy. *Int Braz J Urol.* 2005;31(4):299-308. doi: 10.1590/S1677-55382005000400002

Rodrigues WF, Madeira MFM, Da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-Da-Silva VJ, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by

inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012;165(7):2140–51. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01686.x.

Rosania AE, Low KG, McCormick CM, Rosania DA. Stress, depression, cortisol, and periodontal disease. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):260-6. doi: 10.1902/jop.2009.080334 .

Saito T, Inagaki S, Sakurai K, Okuda K, Ishihara K. Exposure of *P. gingivalis* to noradrenaline reduces bacterial growth and elevates ArgX protease activity. *Arch. Oral Biol*. 2011;56(3):244–50. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.09.014.

Santos JD, de Alvarenga JA, Rossoni RD, García MT, Moraes RM, Anbinder AL, et al. Immunomodulatory effect of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*. 2017 Sep;110:507-11. doi: 10.1016/j.micpath.2017.07.045.

Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol*. 2015;6:171. doi: 10.3389/fphar.2015.00171.

Sharma M, Patterson L, Chapman E, Flood PM. Salmeterol, a long-acting β 2-adrenergic receptor agonist, inhibits macrophage activation by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2017;88:681–92. doi:10.1902/JOP.2017.160464

Shi H, Carion TW, Jiang Y, Chahine A, Steinle JJ, Berger EA. A regulatory role for β -adrenergic receptors regarding the resolvin D1 (RvD1) pathway in the diabetic retina. *PLoS One*. 2017 Nov 2;12(11):e0185383. doi: 10.1371/journal.pone.0185383. eCollection 2017.

Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T. Effect of sympathetic nervous activity on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats. *Arch Oral Biol*.2011;56(11):1404–11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.05.004.

Solbiati J, Duran-Pinedo A, Rocha FG, Gibson 3rd FC, Frias-Lopez J. Virulence of the pathogen *Porphyromonas gingivalis* is controlled by the CRISPR-Cas protein Cas3 mSystems. 2020;5(5):e00852-20. doi: 10.1128/mSystems.00852-20.

Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. Virulence. 2016 Apr 2;7(3):214–29. doi: 10.1080/21505594.2015.1135289.

Vladau M, Cimpean AM, Balica RA, Jitariu AA, Popovici RA, Raica M. VEGF/VEGFR2 axis in periodontal disease progression and angiogenesis: basic approach for a new therapeutic strategy. In Vivo. 2016;30(1):53-60.

Wakisaka S, Youn SH, Kato J, Takemura M, Kurisu K. Neuropeptide Y-immunoreactive primary afferents in the dental pulp and periodontal ligament following nerve injury to the inferior alveolar nerve in the rat. Brain Res. 1996;712(1):11–8. doi: 10.1016/0006-8993(95)01421-7.

Warren K, Postolache T, Groer M, Pinjari O, Kelly D, Reynolds M. Role of chronic stress and depression in periodontal diseases. Periodontol 2000. 2014;64(1):127–38. doi: 10.1111/prd.12036.

Weinstein LI, Revuelta A, Pando RH. Catecholamines and acetylcholine are key regulators of the interaction between microbes and the immune system. Ann NY Acad Sci. 2015 Sep;1351(1):39–51. doi: 10.1111/nyas.12792.

Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Insect Sci. 2017 Jun;24(3):342–57. doi: 10.1111/1744-7917.12325.

Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. Tissue Cell. 2016;48(4):297–304. doi: 10.1016/j.tice.2016.06.007

Wu S-F, Xu G, Qi Y-X, Xia R-Y, Huang J, Ye G-Y. Two splicing variants of a novel family of octopamine receptors with different signaling properties. J Neurochemistry. 2013,129(1):37-47. <https://doi.org/10.1111/jnc.12526>

Zhu YC, Yocom E, Sifers J, Uradu H, Cooper RL. Modulatory effects on *Drosophila* larva hearts: room temperature, acute and chronic cold stress. *J Comp Physiol B*. 2016;186:829–41. doi: 10.1007/s00360-016-0997-x.

Zhu Y, Ma Y, Elefteriou F. Cortical bone is an extraneuronal site of norepinephrine uptake in adult mice. *Bone reports*. 2018;9:188–98. doi: 10.1016/j.bonr.2018.11.002.